341—346　　23564(25)

动 物 学 研 究 1996, 17 (3): 341—346　　CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

白颊长臂猿染色体的研究

刘瑞清 佴文惠 陈玉泽 余定会
(中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室 昆明 650223)

Q959.848　A

摘要 本文对我国云南南部的白颊长臂猿(*H. leucogenys*)染色体的G带、C带、晚复制带及Ag-NORs进行了较为详细的研究。它的2n=52，核型公式为44(M或SM)+6(A)，XY(M，A)。C带表明一些染色体着丝点C带弱化；有的染色体出现插入的和端位的C带；X染色体两臂有端位C带，Y染色体是C带阳性和晚复制的。Ag-NORs的数目，雌体有4个，雄体有5个，Y染色体上具NOR。本文对白颊长臂猿与其它长臂猿间的亲缘关系、核型进化的可能途径进行了讨论。

关键词 白颊长臂猿，染色体带型，云南　灵长目

灵长类中的长臂猿仅有一属 *Hylobates* 4个亚属，其中黑长臂猿(*Nomascus*)亚属曾经被认为只有一个种即黑冠长臂猿 *Hylobates (Nomascus) concolor*，它被分化为6个亚种，白颊长臂猿 *H. concolor leucogenys* 就是其中的一亚种(Ellerman 等，1951)。近年来一些分类学家根据黑长臂猿和白颊长臂猿的形态特征如头骨、牙齿和阴茎骨等形态差异，确认它们为两个独立的种即 *H. concolor* 和 *H. leucogenys*，而且白颊长臂猿还为单型种(马世来等，1986；Groves 等，1990)。白颊长臂猿仅分布在越南和老挝的北部，中国云南南部。本文采用各种染色体显带技术对云南南部的白颊长臂猿核型进行了详细研究，并探讨了与其它长臂猿间的亲缘关系、核型进化的可能途径。

1 材料与方法

1.1 动物来源

两只尚未成年的雌、雄白颊长臂猿(*H. leucogenys*)来自云南南部西双版纳。

1.2 外周血淋巴细胞培养

由静脉抽血，全血培养。培养基组成：199(日本，日水制药株式会社) 80%，新生牛血清20%，PHA 0.13 ml (盐水提取法)。5 ml培养基中加入全血0.3 ml左右。置38℃温箱中培养72 h。终止培养前4 h加入秋水仙素，最终浓度为0.03—0.05μg/ml。0.4%KCl低渗处理25 min。甲醇和冰醋酸(3∶1)固定10 min，重复3次。空气干燥法制片。

1.3 染色体分带

胰酶-Giemsa带(G带)，按Seabright(1971)的方法；C带按Sumner(1972)方法；核仁组织者(NORs)硝酸银染色参照Howell等(1980)方法；复制带参照王建华等(1984)方

本文1995年6月28日收到

法。

1.4 荧光原位杂交(FISH)与检测

主要参照 Lichter 等(1988)、Pinkel 等(1988)和 Wienberg 等(1990)方法进行。生物素标记的人类 Y 染色体探针，由在英国剑桥大学病理系攻读博士学位的杨凤堂提供。

1.5 核型分析

白颊长臂猿核型分析参照 Hsu 等(1969)的报道，按 Levan 等(1964)的标准，依染色体长度递减排列。

2 结果与讨论

根据白颊长臂猿(*H. leucogenys*)雌、雄二体各 100 个中期相观察计数，其 2n＝52(图版Ⅰ-A)，25 对常染色体中，Nos.1—22 是中间着丝点(M)或亚中着丝点染色体(SM)。Nos.23—25 是近端着丝点染色体(A)，其中 No.23 和 No.24 在短臂上具有次缢痕。性染色体 X 为 1 条较大的中间着丝点染色体(M)，Y 是核型中最小的 1 条近端着丝点染色体(A)。核型公式为 44(M 或 SM)+6(A)，XY(M，A)。上述结果与 Hsu 等(1969)报道的 *H. concolor leucogenys* 基本一致。

在 1986 年以前，一般都认为白颊长臂猿是黑冠长臂猿中的一个亚种，有学者直接报道白颊长臂猿为黑冠长臂猿 *H. concolor*(Boer 等，1975；Tuinen 等，1982)。1986 年以后，一些分类学家根据黑长臂猿与白颊长臂猿形态特征的显著差异，确认它们应为两个独立的种，即 *H. concolor* 和 *H. leucogenys*(马世来等，1986；Groves 等，1990)。这两种长臂猿的染色体数目和核型特征基本相似(陈宜峰等，1981；本文作者)，2n 皆为 52。由此看出它们之间有很密切的亲缘关系。

白颊长臂猿染色体 G 带见图版Ⅰ-B。Tuinen 等(1982)曾报道白颊长臂猿和合趾长臂猿(*H. syndactylus*，2n＝50)的 G 带约有 40%的同源性，由此说明它们间的亲缘关系比与其它长臂猿更为密切。

白颊长臂猿的染色体结构异染色质带(C 带)见图版Ⅰ-C。C 带核型中除有些染色体着丝点区域显示 C 带外，还有以下 3 种 C 带分布特征：(1)着丝点异染色质带的弱化，显示在 Nos.1、2 和 17 号染色体。(2)插入异染色质带分布在 Nos.3、5、11 和 12 号染色体上。(3)端位异染色质带：核型中多数染色体具有端位异染色质带，明显分布在 Nos.1—4、6—7、11—14 染色体上，而且在 X 染色体的两臂端部亦有；Y 染色体显示全部异染色质。这与晚复制的 Y 染色体相吻合(图版Ⅱ-C，箭头示)。在哺乳动物中，C 带一般分布在着丝点区域，而端位和插入的 C 带只见于为数不多的种类，如若干种鲸、松鼠猴(*Saimiri*)、羚松鼠(*Ammospermophilus*)、麂鹿(*T. j. williamsoni*)和白眉长臂猿(*H. hoolock leuconedys*)(Hsu，1978；施立明等，1989；刘瑞清等，1987)。在已研究过的长臂猿 C 带核型中观察到有些染色体着丝点区域 C 带弱化或缺乏、臂上有插入和端位的 C 带，甚至有异染色质臂的出现(Tuinen 等，1982；刘瑞清等，1987；本文)。长臂猿的这些异染色质分布特征表明了它们在进化中的特殊地位。

白颊长臂猿的 Ag-NORs 的数目和分布见图版Ⅱ-A(箭头示)。雄性动物的 Ag-NORs 有 5 个，分布在 Nos.23、24 A 染色体短臂的次缢痕区域和 Y 染色体短臂上。在同一细胞中运用荧光原位杂交(flourescence *in situ* hybridization，FISH)和银染技术证

明白颊长臂猿 Y 染色体上具有 NOR(图版Ⅱ-D 和 E，箭头示)，这在哺乳类中非常罕见。迄今研究过的种类中只有狨猴(*Callithri*)、狗(*Canis familiaris*)、貉(*Nyctereutes procyonoides*)、哈氏羚松鼠(*Ammospermophilus harrisi*)、果蝠(*Carollia castanea*)、合趾猿(*H. syndactylus*)和麂鹿(*T. j. williamsoni*)等少数种类的 Y 染色体有 Ag-NOR(Pathak, 1983；Leodbetter 等，1981；施立明等，1989)。我们的结果与 Tuinen 等(1982)曾报道的白颊长臂猿，在 Y 染色体上具有 Ag-NOR 是一致的(表 2)。雌性白颊长臂猿的 Ag-NORs 有 4 个，仍然分布在 Nos.23 和 24 A 染色体短臂的次缢痕区域。在哺乳类中 Ag-NORs 的数目和分布一般较为恒定，具有物种的属性，因而可以作为物种鉴别和探索进化的指标之一。表 2 中列出长臂猿属 Ag-NORs 的数目和分布也许能说明这一点。此外，我们还观察到 Ag-NORs 的联合现象。被观察到的联合形式有 3 种：(1) A-A 型(图版Ⅱ-B1)；(2) A-A-A 型(图版Ⅱ-B2)；(3)A-A-A-A 型(图版Ⅱ-B3)。联合频率大约为 9.0%。Ag-NORs 的联合现象在哺乳动物中较为普遍，联合形式多样，出现率也不尽一致。关于联合形成的机制和生物学意义尚不很清楚。一些学者为此持不同观点(Henderson 等，1977；Zakharov 等，1982)。

表 1　长臂猿 *Hylobates* 染色体比较

Tab. 1　Comparison of chromosomes in *Hylobates*

种名	二倍数(2n)	常染色体臂数 N.F	染色体形态 M&SM	A	X	Y	参考文献
1. 白眉猿亚属 *Bunopithecus*							
缅甸白眉长臂猿 *H. hoolock hoolock*	38	72	36	0	SM	-	Prouty, L. A 等, 1983
云南白眉长臂猿 *H. h. leuconedys*	38	72	36	0	M	圆点 dot	刘瑞清等, 1987
2. 指名亚属 *Hylobates*							
白掌长臂猿 *H. lar*	44	84	42	0	SM	圆点 dot	Dutrilaux, B.等, 1975; 陈宜峰等, 1981
银灰长臂猿 *H. molock*	44	84	42	0	SM	圆点 dot	Chiarelli, B., 1963
敏长臂猿 *H. agilis*	44	84	42	0	SM	SM	Chiarelli, B., 1963
倭长臂猿 *H. klossii*	44	84	42	0	M	-	
3. 合趾猿亚属 *Symphalangus*							
合趾长臂猿 *H. syndactylus*	50	94	46	2	SM	M	Ledbetter, D. H., 1981
4. 黑长臂猿亚属 *Nomascus*							
黑长臂猿 *H. concolor*	52	94	44	6	M	圆点 dot	陈宜峰等, 1981
白颊长臂猿 *H. leucogenys*	52	94	44	6	M	A	本文作者

从表 1 看出，白颊长臂猿和黑长臂猿在现存长臂猿中有最多的染色体数目，二者都是 2n＝52，有 6 条 A 染色体，它们亲缘关系最近，同属黑长臂猿亚属；合趾长臂猿亚属中唯一的种合趾长臂猿，其 2n＝50，有 2 条 A 染色体；指名亚属的 4 个种，2n 均为 44，无 A 染色体；白眉长臂猿亚属唯一的种白眉长臂猿 2n 最少，为 38，也无 A 染色体。如果长臂猿类也象多数哺乳类一样，染色体进化遵循罗伯逊融合或串联易位的进化方式即染色体数目由多变少，双臂染色体数目由少变多。那么白颊长臂猿和黑长臂猿是现生长臂猿中最原始的类群，而白眉长臂猿最为特化。这与宏观形态学的系统分类观点和生态学研究的结果相符合(Groves，1972；Groves 等，1990；蒋学龙等，1994)。

表2 长臂猿属Ag-NORs的数目和分布

Tab. 2 The number and distribution of Ag-NORs in the genus *Hylobates*

种名	性别	二倍体 2n	Ag-NORs 数目	分布 M	Sm	A	X	Y	参考文献
云南白眉长臂猿 *H. hoolock*	♂	38	2		+				刘瑞清等，1987
银灰长臂猿 *H. moloch*	♂	44	2	+					Tantravahi等，1975
合趾长臂猿 *H. syndactylus*	♂	50	3			+		+	Ledbetter等，1981
	♀	50	2			+			Henderson等，1976
白颊长臂猿 *H. leucogenys**	♂	52	5			+		+	Tuinen等，1982
白颊长臂猿 *H. leucogenys*	♂	52	5			+		+	本文作者
	♀	52	4			+			同上

*原文注明为 *H. concolor*。

至于C带异染色质在物种分化中的作用，Yosida(1980)在研究鼠类C带核型进化中发现，着丝点异染色质的弱化和消失、端位和插入异染色质的出现和增多、全臂异染色质化的出现可能是鼠类核型的特化特征。把白颊长臂猿和曾报道过的白眉长臂猿C带相比较，可以发现：(1)白颊长臂猿有10对常染色体和X染色体的两端出现异染色质，而白眉长臂猿未曾发现有这种异染色质；(2)在白颊长臂猿中未发现有完全异染色质臂的出现，而白眉长臂猿至少有两对染色体的短臂全为异染色质的；(3)白颊长臂猿的插入异染色质出现在4对常染色体上，而白眉长臂猿只有3对常染色体有这种异染色质；(4)白颊长臂猿的着丝点C带弱化或消失出现在3对染色体上。经后来对白眉长臂猿的C带仔细观察，发现大多数中期分裂相中也有两对染色体着丝点异染色质弱化或消失。为此，若长臂猿的C带变化象鼠类C带的进化方式一样，似乎白颊长臂猿要比白眉长臂猿特化些。但是，Hsu等(1971)曾指出：染色体间的不对称性易位和臂内倒位可能导致结构异染色质的减少和丢失，也可能导致插入异染色质的增加、甚至出现完全异染色质臂，这些变化都能促进物种的进一步分化。白颊长臂猿和白眉长臂猿2n数目明显不同，这可能是在核型进化中染色体发生罗伯逊融合或串联易位、在这个过程中，端位异染色质丢失；并出现全异染色质臂。另一方面还可能发生着丝粒区域异染色质呈现逆行性进化。这种特化和逆向进化的两种相嵌演化过程可能是长臂猿类结构异染色质演化的一种特征。当然这些演化尚需更多的长臂猿C带加以证实。

在现生长臂猿属的4个亚属中(表1)，黑长臂猿亚属的2n数和A染色体数与合趾长臂猿最为接近，而黑长臂猿亚属中的白颊长臂猿与合趾长臂猿G带有较高的相似性(Tuinen等，1982)；在Ag-NORs的分布特征上，两者雄性Y染色体均有核仁组织者而其它亚属的长臂猿则无。这充分说明：黑长臂猿亚属与合趾长臂猿亚属间的亲缘关系要比与指名亚属和白眉长臂猿亚属的亲缘关系更为密切。

致谢 本所动物分类区系研究室王应祥先生提供有关系统分类和分布资料；冯庆实验师提供实验动物；在英国剑桥大学病理系攻读博士学位的杨凤堂提供人染色体基因文库探针和协助实验，特此致谢。

图 版 说 明

图版Ⅰ(Plate Ⅰ)

A：白颊长臂猿常规核型，B：G带，C：C带[Convertional karyotype (A), G-banding patterns (B) and C-bands (C) of white-cheeked gibbon]。

图版Ⅱ(Plate Ⅱ)

A：白颊长臂猿染色体的Ag-NORs(箭头示)，B：Ag-NORs的联合，C：染色体复制带及晚复制的Y染色体(箭头示)D：荧光原位杂交显示的Y染色体(箭头示)，E：Y染色体上的Ag-NORs(箭头示)[Ag-NORs on the chromosomes (arrows) (A), association of Ag-NORs(B), Y chromosome is shown by FISH (arrow) (D), Y chromosomeposses Ag-NORs (arrow) (E) and the chromosoma replicating patternswith late replicating Y chromosome(arrow) (C) of white-cheekedgibbon (*H. leucogenys*)]。

参 考 文 献

马世来，王应祥，1986. 中国南部长臂猿的分类与分布——附三个新亚种的描述. 动物学研究，7(4)：393—410.

王建华，张锡然，陈玉泽等，1984. 一种同时显示哺乳动物染色体复制带和鉴别晚复制性染色体的新技术. 动物学研究，5(3增刊)：5—9

刘瑞清，施立明，陈玉泽，1987. 白眉长臂猿(*Hylobates hoolock leuconedy*)的染色体研究. 兽类学报，7(1)：1—7.

陈宜峰，罗丽华，单祥年等，1981. 中国灵长类染色体. 北京：科学出版社，158—162.

施立明，陈玉泽，1989. 鼷鹿云南亚种(*Tragulus javanicus williamsoni*)的核型分析. 动物学报，35(1)：41—44.

蒋学龙，马世来，王应祥，1994. 黑长臂猿(*Hylobates concolor*)的配偶制及其与行为、生态和进化的关系. 人类学学报，13(4)：344—352.

Boer D L E M, Oostrum-Van V D H C, 1975. A note on the karyotypes and chromosome associations of the Hylobatidae, with special reference to *Hylobates (Nomascus) concolor*. *J. Human Evol.*, 4: 559-564.

Chiarelli B, 1963. Coparative morphometric analysis of the primates chromosomes.Ⅲ. The chromosomes of genera *Hylobates colobus* and *Presbytis*. *Caryologia*. 16: 637-648.

Dutrilau X B, 1975. Analysis of the karyotype of two species of gibbons (*Hylobates lar* and *H. concolor*) by various banding techniques. *Cytogenet. Cell Genet*. 15: 81-91.

Ellerman J R, Morrison-Scott T C S, 1951. Chechlist of paraearctic and Indian mammals. London: Brit. Mus. (Nat. Hist). 202-203.

Goodpasture C, Bloom S E, 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma (Berl.)*, 53: 37-50.

Groves C P, 1972. Systematics and phylogeny of gibbons. In: D M Rumbaugh, ed. Gibbon and siamang (Karher, Basel) 1: 1-89.

Groves C P, Wang Yingxiang, 1990. The gibbons of the subgenus nomscus (primates, mammalia). Zoological Research, 11(2): 147-154.

Henderson L M, Bruere A N, 1977 Association of nucleolus organizer chromosomes in domestic sheep (*Avis aries*) shown by silver staining. *Cytogenet. Cell Genet*.,19: 326-334.

Henderson A S, Atwood K C, Warburton D, 1976. Chromosomal distribution of rDNA in *Pan paniscus*, *Gorilla gorilla beringei* and *Symphalangus syndactylus*: Comparison to related primates. *Chromosoma (Berl.)*, 59: 147-155.

Howell M K, Black D A, 1980. Controlled siver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colliodal developer: a 1-step methed. *Experientia*, 36: 1014-1015.

Hsu T C, Benirschke K, 1969. *Hylobates concolor leucogenys* 2n=52. *An atlas of mammalian chromosomes*, 3: 149.

Ledbetter D H, 1981. NOR-bearing Y chromosome in a primate, *Hylobates (Symphalangus) syndactylus*. *Cell Genet.*, 29: 250-252.

Levan A, Fredga K, Sandberg A, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.

Lichter P, Cremer T, Borden J *et al.*, 1988. Delineation of individual chromosomes in interphase and metaphase cells by *in situ* suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum. Genet.*, 80: 224-234.

Pathak S, 1983. The behavior of X chromosomes during meiosis In: Cytogenetics of the mammalian X chromosome, Part A: Basic mechanism of X chromosome behavior. N. Y.: Alan R. Liss, Inc. 67-106.

Pinkel D, Landegent J, Collins C, 1988. Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific li-

braries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **85**: 9138-9142

Prouty L A, Buchanan P D *et al.*, 1983. Taxonomic note Bunopithecus: A genus-level taxon for the hoolock gibbon (*Hylobates hoolock*) *American Journal of Primatology*, 5: 83-87.

Seabright M A, 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, **11**: 971-972

Sumner A T, 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res*, **75**: 304-306.

Tantravahi R, Dev V G, Firschein I L *et al*, 1975. Karyotype of the gibbons *Hylobates lar* and *H moloch* Inversion in chromosome 7. *Cytogenet. Cell Genet.*, **15**: 92-102.

Tuinen P V, Ledbetter D H, 1982 Cytogenetic comparison of *Hylobates* (*Symphalangus*) *syndactylus* and *Hylobates* (*Nomascus*) *concolor*. *Mammal. Chromosome Newsl.*, **23**: 49.

Wienberg J, Jauch A, Stanyon R *et al.*, 1990. Molecular cytotaxonomy of primates by chromosomal *in situ* suppression Hybridization. *Genomics*, **8**: 347-350.

Yosida T H, 1980. Cytogenetics of the black rat. In: Karyotype evolution and species differentiation. University of Tokyo Press 85-100

Zakharov A F, Davuclov A Z, Benjush V A *et al.*, 1982 Genetic determination of NOR activity in human lymphocytes from twins. *Hum. Genet.*, **60**: 24-29.

A STUDY ON THE CHROMOSOMES OF WHITE-CHEEKED GIBBON (*Hylobates leucogenys*)

Liu Ruiqing Nai Wenhui Chen Yuze Yu Dinghui

(*Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences* 650223)

Abstract

White-cheeked gibbon (*H. leucogenys*) is distributed in the south of Yunnan, China. The chromosomes of a female and a male were studied by several banding techniques (G-, C- and Ag-staining), and a techniqe for simultaneous exhibiting chromosome replication patterns and late replicating Y chromosome.

The diploid chromosome number is 52. There are 22 pairs of metacentrics or submetacentrics (Nos. 1-22); 3 pairs of acrocentrics(Nos. 23-25), and chromosomes Nos. 23-24 with a secondary constriction near the centromere on the short arm. The X chromosome is a large metacentric, and the Y, the smallest acrocentric. Its karyotype formula is 44(M or SM) + 6(A), XY(M, A).

The centrimeric distribution of heterochromatin has been demonstrated in some chromosomes. In addion, there are 3 kinds of heterochromatin on the chromosomes: (1) absent of centromeric heterochromatin, (2) interstitial heterochromatin, (3) terminal heterochromatin. Interstitial heterochromatin has been observed on the biarm of X chromosome. Y chromosome is completely C-band positive.

Silver staining revealed 5 chromosomes with NORs in the male specimen. 4 Ag-NORs of them are located on the secondary constriction of chromosomes 23 and 24 respectively, and one of them is located on the Y chromosome which has been confirmed by Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in the same cell. There are 4 chromosomes with Ag-NORs in the female specimen, and they are also located on the secondary constriction of chromosomes 23 and 24. Moreover, the association of Ag-NORs have been observed.

Base on the above results, the relationship in gibbons and the way of chromosome evolution in the genus *Hylobates* have been discussed.

Key words *H. leucogencys*, Banding patterns of chromosome, Yunnan

A

1—7

8—14

15—21

22—25

X Y

B

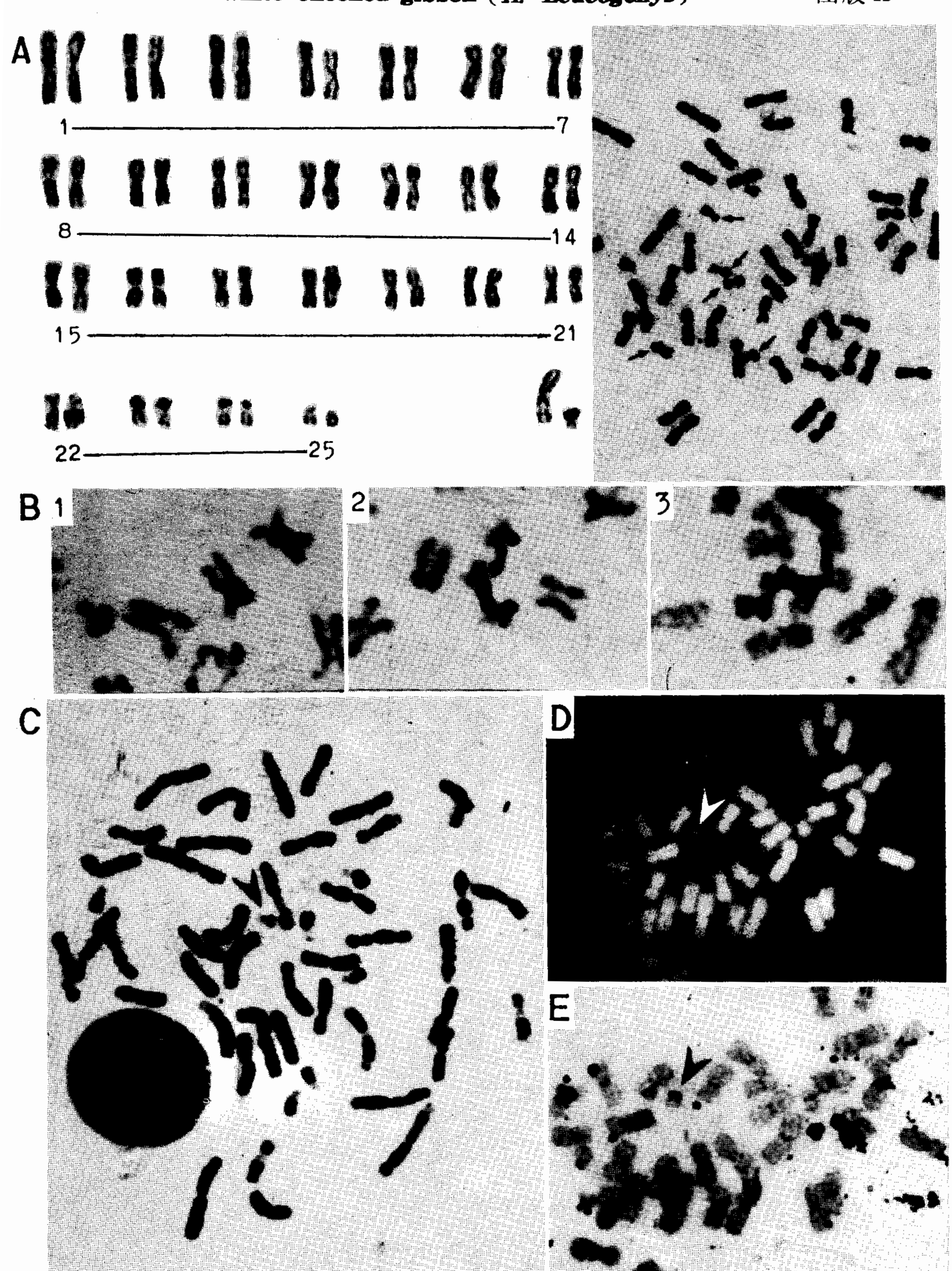
C

（图版说明见正文）

刘瑞清等：白颊长臂猿的染色体研究

Liu Ruiqing *et al*.: A study on the chromosomes of white-cheeked gibbon (*H. Leucogenys*)

图版 II



(图版说明在正文内)